

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-171189

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)7月2日

C 12 N 15/53
// C 12 N 9/02

ZNA

7823-4B
8717-4B

C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全22頁)

⑯ 発明の名称 ルシフェラーゼ遺伝子

⑰ 特 願 昭63-322029

⑱ 出 願 昭63(1988)12月22日

⑲ 発 明 者 梶 山 直 樹 千葉県野田市宮崎101-2
 ⑲ 発 明 者 辰 巳 宏 樹 千葉県野田市柳沢65-1
 ⑲ 発 明 者 中 野 衛 一 埼玉県岩槻市木曾良2-86
 ⑲ 出 願 人 キツコマン株式会社 千葉県野田市野田339番地
 ⑲ 代 理 人 弁理士 平木 祐輔 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

ルシフェラーゼ遺伝子

2. 特許請求の範囲

- (1) ルシオラ・ラテラリスに由来し、下記の制限酵素開裂地図で規定されるルシフェラーゼ遺伝子。

BI S BV A H H BI S BI
 [] [] [] [] [] [] [] [] []

(式中、BIはBcoRI, SはSapI, BVはBcoRV, AはApaI, HはHpaIをそれぞれ示す)

- (2) 下記に示されるアミノ酸配列をコードすることとを特徴とする請求項(1)記載のルシフェラーゼ遺伝子。

Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile
 Val Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Ile
 Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg
 Lys Tyr Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly
 Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu Thr Gly
 Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu

Lys Ser Cys Cys Leu Gly Glu Ala Leu Lys
 Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile
 Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe
 Phe Ile Pro Val Leu Ala Gly Leu Phe Ile
 Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile
 Tyr Thr Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu
 Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val Phe Ser
 Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr
 Val Gln Lys Thr Val Thr Ala Ile Lys Thr
 Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr
 Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile
 Lys Lys Asn Thr Pro Gln Gly Phe Lys Gly
 Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg
 Lys Glu Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser
 Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val
 Gln Leu Thr His Glu Asn Ala Val Thr Arg
 Phe Ser His Ala Arg Asp Pro Ile Tyr Gly
 Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu
 Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly
 Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu Thr Cys

Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe³⁷⁰
 Asp Glu Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Glu³⁸⁰
 Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile Leu Val³⁹⁰
 Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser⁴⁰⁰
 Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Asp Leu Ser Asn⁴¹⁰
 Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro⁴²⁰
 Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala⁴³⁰
 Arg Arg Phe Asn Leu Pro Gly Val Arg Glu⁴⁴⁰
 Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala⁴⁵⁰
 Ile Ile Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys⁴⁶⁰
 Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val Pro Leu⁴⁷⁰
 Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr⁴⁸⁰
 Lys Lys Thr Leu Gly Pro Asn Arg Arg Gly⁴⁹⁰
 Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met⁵⁰⁰
 Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr⁵¹⁰
 Arg Glu Ile Ile Asp Glu Glu Gly Trp Leu⁵²⁰
 His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu⁵³⁰
 Glu Lys His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu⁵⁴⁰
 Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Glu⁵⁵⁰
 Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu⁵⁶⁰

Leu Gln His Pro Asn Ile Phe Asp Ala Gly⁴⁷⁰
 Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly⁴⁸⁰
 Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Glu⁴⁹⁰
 Lys Gly Lys Ser Met Thr Glu Lys Glu Val⁵⁰⁰
 Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn⁵¹⁰
 Ala Lys Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe⁵²⁰
 Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly⁵³⁰
 Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile⁵⁴⁰
 Leu Lys Lys Pro Val Ala Lys Met⁵⁵⁰

(3) 下記に示される塩基配列で表わされる請求項

(1)又は(2)記載のルシフェラーゼ遺伝子。

ATG GAA AAC ATG GAG AAC GAT GAA AAT ATT³⁰⁰
 GTG TAT GGT CCT GAA CCA TTT TAC CCT ATT³¹⁰
 GAA GAG GGA TCT GCT GGA GCA CAA TTG CGC³²⁰
 AAG TAT ATG GAT CGA TAT GCA AAA CTT GGA³³⁰
 GCA ATT GCT TTT ACT AAC GCA CTT ACC GGT³⁴⁰
 GTC GAT TAT ACG TAC GCC GAA TAC TTA GAA³⁵⁰
 AAA TCA TGC TGT CTA GGA GAG GCT TTA AAG³⁶⁰
 AAT TAT GGT TTG GTT GTT GAT GGA AGA ATT³⁷⁰

GCG TTA TGC AGT GAA AAC TGT GAA GAA TTC³⁷⁰
 TTT ATT CCT GTA TTA GCC GGT TTA TTT ATA³⁸⁰
 GGT GTC GGT GTG GCT CCA ACT AAT GAG ATT³⁹⁰
 TAC ACT CTA CGT GAA TTG GTT CAC AGT TTA⁴⁰⁰
 GGC ATC TCT AAG CCA ACA ATT GTA TTT AGT⁴¹⁰
 TCT AAA AAA GGA TTA GAT AAA GTT ATA ACT⁴²⁰
 GTA CAA AAA ACG GTA ACT GCT ATT AAA ACC⁴³⁰
 ATT GTT ATA TTG GAC AGC AAA GTG GAT TAT⁴⁴⁰
 AGA GGT TAT CAA TCC ATG GAC AAC TTT ATT⁴⁵⁰
 AAA AAA AAC ACT CCA CAA GGT TTC AAA GGA⁴⁶⁰
 TCA AGT TTT AAA ACT GTA GAA GTT AAC CGC⁴⁷⁰
 AAA GAA CAA GTT GCT CTT ATA ATG AAC TCT⁴⁸⁰
 TCG GGT TCA ACC GGT TTG CCA AAA GGT GTG⁴⁹⁰
 CAA CTT ACT CAT GAA AAT GCA GTC ACT AGA⁵⁰⁰
 TTT TCT CAC GCT AGA GAT CCA ATT TAT GGA⁵¹⁰
 AAC CAA GTT TCA CCA GGC ACG GCT ATT TTA⁵²⁰
 ACT GTA GTA CCA TTC CAT CAT GGT TTT GGT⁵³⁰
 ATG TTT ACT ACT TTA GGC TAT CTA ACT TGT⁵⁴⁰
 GGT TTT CGT ATT GTC ATG TTA ACG AAA TTT⁵⁵⁰
 GAC GAA GAG ACT TTT TTA AAA ACA CTG CAA⁵⁶⁰

GAT TAC AAA TGT TCA AGC GTT ATT CTT GTA³⁷⁰
 CCG ACT TTG TTT GCA ATT CTT AAT AGA AGT³⁸⁰
 GAA TTA CTC GAT AAA TAT GAT TTA TCA AAT³⁹⁰
 TTA GTT GAA ATT GCA TCT GGC GGA GCA CCT⁴⁰⁰
 TTA TCT AAA GAA ATT GGT GAA GCT GTT GCT⁴¹⁰
 AGA CGT TTT AAT TTA CCG GGT GTT CGT CAA⁴²⁰
 GGC TAT GGT TTA ACA GAA ACA ACC TCT GCA⁴³⁰
 ATT ATT ATC ACA CCG GAA GGC GAT GAT AAA⁴⁴⁰
 CCA GGT GCT TCT GGC AAA GTT GTG CCA TTA⁴⁵⁰
 TTT AAA GCA AAA GTT ATC GAT CTT GAT ACT⁴⁶⁰
 AAA AAA ACT TTG GGC CCG AAC AGA CGT GGA⁴⁷⁰
 GAA GTT TGT GTA AAG GGT CCT ATG CTT ATG⁴⁸⁰
 AAA GGT TAT GTA GAT AAT CCA GAA GCA ACA⁴⁹⁰
 AGA GAA ATC ATA GAT GAA GAA GGT TGG TTG⁵⁰⁰
 CAC ACA GGA GAT ATT GGG TAT TAC GAT GAA⁵¹⁰
 GAA AAA CAT TTC TTT ATC GTG GAT CGT TTG⁵²⁰
 AAG TCT TTA ATC AAA TAC AAA GGA TAT CAA⁵³⁰
 GTA CCA CCT GCT GAA TTA GAA TCT GTT CTT⁵⁴⁰
 TTG CAA CAT CCA AAT ATT TTT GAT GCC GGC⁵⁵⁰
 GTT GCT GGC GTT CCA GAT CCT ATA GCT GGT⁵⁶⁰

GAG CTT CCG GGA GCT GTT GTT GTA CTT GAA¹⁴⁹⁰
 AAA GGA AAA TCT ATG ACT GAA AAA GAA GTA¹⁵⁰⁰
 ATG CAT TAC GTT GCT AGT CAA GTT TCA AAT¹⁵¹⁰
 GCA AAA CGT TTG CGT GGT GGT GTC CGT TTT¹⁵²⁰
 GTG GAC GAA GTA CCT AAA GGT CTC ACT GGT¹⁵³⁰
 AAA ATT GAC GGT AAA GCA ATT AGA GAA ATA¹⁵⁴⁰
 CTG AAG AAA CCA GTT GCT AAG ATG¹⁵⁵⁰

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、ルシオラ・ラテラリス (*Luciola lateralis*、ヘイケボタル) 由来のルシフェラーゼ遺伝子に関する。

(従来の技術)

ルシオラ (*Luciola*) 属ホタルのルシフェラーゼは、収集されたルシオラ属ホタルより分離、精製されて得られているに過ぎない (ブ洛克・ナトル・アカド・サイ (Proc. Natl. Acad. Sci.)、第74巻、第7号、第2799~2802頁 (1977))。

上記ルシフェラーゼは、例えば、ATPの定量用酵素として極めて有用な酵素である。

(発明が解決しようとする課題)

しかしながら、上記ルシフェラーゼは、昆虫由来であるため、その製造には、ルシオラ属ホタルを自然界より採取するか、あるいは、該ホタルを繁殖し、得られた該ホタルよりルシフェラーゼを分離、精製しなければならない、その製造には、多大な時間と労力を要するものであった。

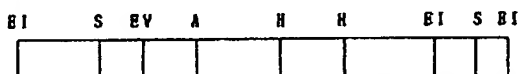
(課題を解決するための手段)

そこで、本発明者等は、上記の問題点を解決すべく種々検討した結果、ルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼをコードする遺伝子を含有するDNAをベクターDNAに挿入した組み換え体DNAを得、この組み換え体DNAをエッシャーシア (*Escherichia*) 属に属する微生物に含ませたルシフェラーゼ生産能を有する微生物を培地に培養することにより、短期間のうちに効率よくルシフェラーゼが生産されることを知り特許出願を行った (昭和63年7月1日付特許出願明細書)。

その後、本発明者等は、ルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼ遺伝子について更に検討し

た結果、ルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼ遺伝子を初めて単離及び構造決定することに成功し、本発明を完成した。即ち本発明は、

- (1) ルシオラ・ラテラリスに由来し、下記の制限酵素開裂地図で規定されるルシフェラーゼ遺伝子。



(式中、BIはEcoRI、SはSspI、EVはEcoRV、AはApaI、HはHpaIをそれぞれ示す)

- (2) 下記に示されるアミノ酸配列をコードすることを特徴とする前記(1)記載のルシフェラーゼ遺伝子。

Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile¹⁰
 Val Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Ile²⁰
 Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg³⁰
 Lys Tyr Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly⁴⁰
 Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu Thr Gly⁵⁰
 Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu⁶⁰
 Lys Ser Cys Cys Leu Gly Glu Ala Leu Lys⁷⁰

Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile⁸⁰
 Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe⁹⁰
 Phe Ile Pro Val Leu Ala Gly Leu Phe Ile¹⁰⁰
 Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile¹¹⁰
 Tyr Thr Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu¹²⁰
 Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val Phe Ser¹³⁰
 Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr¹⁴⁰
 Val Gln Lys Thr Val Thr Ala Ile Lys Thr¹⁵⁰
 Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr¹⁶⁰
 Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile¹⁷⁰
 Lys Lys Asn Thr Pro Gln Gly Phe Lys Gly¹⁸⁰
 Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg¹⁹⁰
 Lys Glu Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser²⁰⁰
 Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val²¹⁰
 Gln Leu Thr His Glu Asn Ala Val Thr Arg²²⁰
 Phe Ser His Ala Arg Asp Pro Ile Tyr Gly²³⁰
 Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu²⁴⁰
 Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly²⁵⁰
 Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu Thr Cys²⁶⁰
 Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe²⁷⁰

Asp Glu Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu 300
 Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile Leu 310
 Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg 320
 Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Asp Leu Ser 330
 Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala 340
 Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val 350
 Arg Arg Phe Asn Leu Pro Gly Val Arg 360
 Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser 370
 Ile Ile Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp 380
 Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val Pro 390
 Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp 400
 Lys Lys Thr Leu Gly Pro Asn Arg Arg 410
 Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu 420
 Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala 430
 Arg Glu Ile Ile Asp Glu Glu Gly Trp 440
 His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp 450
 Glu Lys His Phe Phe Ile Val Asp Arg 460
 Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr 470
 Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val 480
 Leu Glu His Pro Asn Ile Phe Asp Ala 490

Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala 500
 Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu 510
 Lys Gly Lys Ser Met Thr Glu Lys Glu 520
 Met Asp Tyr Val Ala Ser Glu Val Ser 530
 Ala Lys Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg 540
 Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr 550
 Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu 560
 Leu Lys Lys Pro Val Ala Lys Met 570

(3) 下記に示される塩基配列で表わされる前記
 (1)又は(2)記載のルシフェラーゼ遺伝子。

ATG GAA AAC ATG GAG AAC GAT GAA AAT ATT 30
 GTG TAT GGT CCT GAA CCA TTT TAC CCT ATT 40
 GAA GAG GGA TCT GCT GGA GCA CAA TTG CGC 50
 AAG TAT ATG GAT CGA TAT GCA AAA CTT GGA 60
 GCA ATT GCT TTT ACT AAC GCA CTT ACC GGT 70
 GTC GAT TAT ACG TAC GCC GAA TAC TTA GAA 80
 AAA TCA TGC TGT CTA GGA GAG GCT TTA AAG 90
 AAT TAT GGT TTG GTT GTT GAT GGA AGA ATT 100
 GCG TTA TGC AGT GAA AAC TGT GAA GAA TTC 110

TTT ATT CCT GTA TTA GCC GGT TTA TTT ATA 300
 GGT GTC GGT GTG GCT CCA ACT AAT GAG ATT 310
 TAC ACT CTA CGT GAA TTG GTT CAC AGT TTA 320
 GGC ATC TCT AAG CCA ACA ATT GTA TTT AGT 330
 TCT AAA AAA GGA TTA GAT AAA GTT ATA ACT 340
 GTA CAA AAA ACG GTA ACT GCT ATT AAA ACC 350
 ATT GTT ATA TTG GAC AGC AAA GTG GAT TAT 360
 AGA GGT TAT CAA TCC ATG GAC AAC TTT ATT 370
 AAA AAA AAC ACT CCA CAA GGT TTC AAA GGA 380
 TCA AGT TTT AAA ACT GTA GAA GTT AAC CGC 390
 AAA GAA CAA GTT GCT CTT ATA ATG AAC TCT 400
 TCG GGT TCA ACC GGT TTG CCA AAA GGT GTG 410
 CAA CTT ACT CAT GAA AAT GCA GTC ACT AGA 420
 TTT TCT CAC GCT AGA GAT CCA ATT TAT GGA 430
 AAC CAA GTT TCA CCA GGC ACG GCT ATT TTA 440
 ACT GTA GTA CCA TTC CAT CAT GGT TTT GGT 450
 ATG TTT ACT ACT TTA GGC TAT CTA ACT TGT 460
 GGT TTT CGT ATT GTC ATG TTA ACG AAA TTT 470
 GAC GAA GAG ACT TTT TTA AAA ACA CTG CAA 480
 GAT TAC AAA TGT TCA AGC GTT ATT CTT GTA 490

CCG ACT TTG TTT GCA ATT CTT AAT AGA AGT 500
 GAA TTA CTC GAT AAA TAT GAT TTA TCA AAT 510
 TTA GTT GAA ATT GCA TCT GGC GGA GCA CCT 520
 TTA TCT AAA GAA ATT GGT GAA GCT GTT GCT 530
 AGA CGT TTT AAT TTA CCG GGT GTT CGT CAA 540
 GGC TAT GGT TTA ACA GAA ACA ACC TCT GCA 550
 ATT ATT ATC ACA CCG GAA GGC GAT GAT AAA 560
 CCA GGT GCT TCT GGC AAA GTT GTG CCA TTA 570
 TTT AAA GCA AAA GTT ATC GAT CTT GAT ACT 580
 AAA AAA ACT TTG GGC CCG AAC AGA CGT GCA 590
 GAA GTT TGT GTA AAG GGT CCT ATG CTT ATG 600
 AAA GGT TAT GTA GAT AAT CCA GAA GCA ACA 610
 AGA GAA ATC ATA GAT GAA GAA GGT TGG TTG 620
 CAC ACA GGA GAT ATT GGG TAT TAC GAT GAA 630
 GAA AAA CAT TTC TTT ATC GTG GAT CGT TTG 640
 AAG TCT TTA ATC AAA TAC AAA GGA TAT CAA 650
 GTA CCA CCT GCT GAA TTA GAA TCT GTT CTT 660
 TTG CAA CAT CCA AAT ATT TTT GAT GCC GGC 670
 GTT GCT GGC GTT CCA GAT CCT ATA GCT GGT 680
 GAG CTT CCG GGA GCT GTT GTT GTA CTT GAA 690

```

AAA GGA AAA TCT ATG ACT GAA AAA GAA GTA1500
ATG GAT TAC GTT GCT AGT CAA GTT TCA AAT1530
GCA AAA CGT TTG CGT GGT GGT GTC CGT TTT1560
GTG GAC GAA GTA CCT AAA GGT CTC ACT GGT1590
AAA ATT GAC GGT AAA GCA ATT AGA GAA ATA1620
CTG AAG AAA CCA GTT GCT AAG ATG

```

以下、本発明を詳細に説明する。

先ず、ルシオラ・ラテラリス(*Luciola lateralis*) (ヘイケボタル) のルシフェラーゼをコードする遺伝子を含有するDNAを検索する際、プローブとしてホタルの1種である同属のルシオラ・クルシアタ(*Luciola cruciata*) (ゲンジボタル) のルシフェラーゼをコードする遺伝子を含有するDNAを使用し、また、ルシオラ・クルシアタのルシフェラーゼをコードする遺伝子を含有するDNAを検索する際、プローブとしてホタルの1種であるフォティナス・ピラリス(*Photinus pyralis*) (アメリカホタル) のルシフェラーゼをコードする遺伝子を含有するDNAを使用する。

従って、以下に先ずフォティナス・ピラリスの

フェラーゼ血清を使用するのであるが、該血清は、例えば、「免疫化学」山村雄一、第43～50頁(1973)記載の方法により得ることができる。

ルシフェラーゼをコードするm-RNAよりc-DNAを合成するには、例えば、「モル・セル・バイオル」(*Mol. Cell Biol.*)、第2巻、第161頁(1982)及びジーン(*Gene*)、第25巻、第263頁(1983)記載の方法により行なうことができる。

次いで、このようにして得られたc-DNAをベクターDNA、例えば、プラスミドpMCE10 DNA、プラスミドpKN305 (「アグル・バイオル・ケム」(*Agri. Biol. Chem.*)、第50巻、第271頁(1986)記載の大腸菌トリプトファンオペロンのプロモーターを有するプラスミド)及びプラスミドpMC1843 (「メソズ・イン・エンザイモロジー」(*Methods in Enzymology*)、第100巻、第293～308頁(1983)記載の大腸菌β-ガラクトシダーゼ構造遺伝子を有するプラスミド)を用いて作製したプラスミド等に組み込み、種々の組み換え体プラスミドDNAを得、該DNAを用いて例え

ルシフェラーゼをコードする遺伝子の調製法について述べ、次にルシオラ・クルシアタ(*Luciola cruciata*) のルシフェラーゼをコードする遺伝子の調製法について述べ、最後に、ルシオラ・ラテラリスのルシフェラーゼをコードする遺伝子の調製法について述べる。

ホタルの1種であるフォティナス・ピラリスの尾部よりm-RNAを調製するには、例えば、「モレキュラー・クローニング」(*Molecular Cloning*)、第196頁、「コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー」(*Cold Spring Harbor Laboratory*)(1982)及び「分子遺伝学実験法」小関治男、志村令郎、第66～67頁(1983)記載の方法等により得ることができる。

得られたm-RNAよりルシフェラーゼをコードするm-RNAを濃縮するには、例えば、「バイオメディカル・リサーチ」(*Biomedical Research*)、第3巻、第534～540頁(1982)記載の方法により行なうことができる。

なお、この際、ルシフェラーゼに対する抗ルシ

ば、大腸菌(*E. coli*) DH1(ATCC 33849)、大腸菌(*E. coli*) HB101(ATCC 33694)等をハナハン(Banahan)の方法(「ディーエヌエイ・クローニング」(*DNA Cloning*)、第1巻、第109～135頁(1985))により形質転換し、種々の形質転換株を得る。

なお、このようにして得られた形質転換株の有する組み換え体プラスミドDNAは、大腸菌β-ガラクトシダーゼ構造遺伝子の途中にc-DNAが組み込まれたプラスミドであって、c-DNAによりコードされているペプチドは、β-ガラクトシダーゼと融合した蛋白質として発現するものである。

上記の種々な形質転換株よりルシフェラーゼをコードするc-DNAを検出するには、形質転換株を培養することにより、固形蛋白質を発現させ、抗ルシフェラーゼ血清と交差する蛋白質が存在するか否かにより検出することができ、例えば、「アグリック・バイオル・ケム」(*Agric. Biol. Chem.*)、第50巻、第271頁(1986)及び「アナル・

バイオケム」(Anal. Biochem.)、第112巻、第195頁(1981)記載の方法等により行なうことができる。

次いで、不完全なルシフェラーゼのc-DNAを³²Pを用いニックトランスレーション法〔「モレキュラー・クローニング」(Molecular Cloning)、第109～112頁、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)、(1982)及び「ジェイ・モル・バイオル」(J. Mol. Biol.)、第113巻、第23～251頁(1977)〕により標識したのち、該c-DNAをプローブとしてコロニーハイブリダイゼーション法〔「蛋白質・核酸・酵素」第26巻、第575～579頁(1981)〕によりプラスミドpUC19 DNA(宝酒造社製)をベクターとして作成したc-DNAのジーンバンクのライブラリーより1.8 Kbのルシフェラーゼをコードするc-DNAを含有するプラスミドDNAを得ることができる。

そして、このようにして得られた組み換え体プラスミドDNAよりフォティナス・ピラリス由来のルシフェラーゼをコードする遺伝子を含有する

DNAを得るには、該プラスミドDNAに、制限酵素、例えばEcoRI及びClaIを温度30～40℃、好ましくは37℃で1～24時間、好ましくは2時間作用させ得られる反応終了液を、アガロースゲル電気泳動法〔「モレキュラー・クローニング」(Molecular Cloning)、第150頁、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)(1982)記載〕で処理することにより得ることができる。

次に、ルシオラ・クルシアタのルシフェラーゼをコードする遺伝子の調製方法について述べる。

ルシオラ・クルシアタの尾部からのm-RNAの調製及びm-RNAからのc-DNAの合成は、例えば、上述したフォティナス・ピラリスのm-RNAの調製法及びc-DNAの合成法と全く同様に行なうことができる。

次いで、このようにして得られたc-DNAをベクターDNA、例えば、プラスミドpUC19 DNA等に組み込み、種々の組み換え体プラスミドDNAを得、該DNAを用いて例えば、大腸菌(E.

coli) DH1(ATCC 33849)、大腸菌(E. coli) HB101(ATCC 33694)等をハナハン(Hanahan)の方法〔「ディー・エヌ・エイ・クローニング」(DNA Cloning)、第1巻、第109～135頁(1985)〕により形質転換し、種々の形質転換株を得る。

次いで、フォティナス・ピラリス由来のルシフェラーゼをコードする遺伝子を含有するDNAを³²Pを用いニックトランスレーション法〔「モレキュラー・クローニング」(Molecular Cloning)、第109～112頁、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)(1982)及び「ジェイ・モル・バイオル」(J. Mol. Biol.)、第113巻、第237～251頁(1977)〕により標識したのち、該c-DNAをプローブとしたコロニーハイブリダイゼーション法〔「蛋白質・核酸・酵素」第26巻、第575～579頁(1981)〕により、プラスミドpUC19 DNAをベクターとして作成したルシオラ・クルシアタ由来のc-DNAのジーンバンクのライブラリーよりルシフェラーゼをコードするc-DNA(2.0 Kb)を含有するプラスミ

ドDNAを含有する大腸菌を得ることができる。

このようにして得られた微生物より純化された組み換え体DNAを得るには、例えば、「ブロック・ナトル・アカデ・サイ」(Proc. Natl. Acad. Sci.)、第62巻、第1159～1166頁(1969)記載の方法などにより得ることができる。

そして、このようにして得られた組み換え体プラスミドDNAよりルシオラ・クルシアタ由来のルシフェラーゼをコードする遺伝子を含有するDNAを得るには、該プラスミドDNAに、制限酵素、例えばPstIを温度30～40℃、好ましくは37℃で1時間～24時間、好ましくは2時間作用させて反応終了液を、アガロースゲル電気泳動法〔「モレキュラー・クローニング」(Molecular Cloning)、第150頁、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)(1982)記載〕で処理することにより得ることができる。

次に、ルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼをコードする遺伝子の調製方法等について述べる。

ルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼをコードするm-RNAは、ルシオラ・ラテラリス尾部に存在するため該尾部は、m-RNA採取源として好ましい。

ルシオラ・ラテラリスの尾部からのm-RNAの調製及びm-RNAからのc-DNAの合成は、例えば、上述したフォティナス・ピラリスのm-RNAの調製法及びc-DNAの合成法と全く同様に行なうことができる。

次いで、このようにして得られたc-DNAをベクターDNA、例えば、プラスミドpUC119 DNA等に組み込み、種々の組み換え体プラスミドDNAを得、該DNAを用いて例えば、大腸菌(*E. coli*) DH1(ATCC 33849)、大腸菌(*E. coli*) HB101(ATCC 33694)等をハナハン(Hanahan)の方法〔「ディーエヌエイ・クローニング」(DNA Cloning)、第1巻、第109~135頁(1985))により形質転換し、種々の形質転換株を得る。

次いで、前述の如くして得られたルシオラ・クルシアタ由来のルシフェラーゼをコードする遺伝

子を含有するDNAを³²Pを用いニックトランスレーション法〔「モレキュラー・クローニング」(Molecular Cloning)、第109~112頁、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)(1982)及び「ジェイ・モル・バイオル」(*J. Mol. Biol.*)、第113巻、第237~251頁(1977))により標識したのち、該c-DNAをプローブとしたコロニーハイブリダイゼーション法〔「蛋白質・核酸・酵素」第26巻、第575~579頁(1981))により、プラスミドpUC119 DNAをベクターとして作成したルシオラ・ラテラリス由来のc-DNAのジーンバンクのライブラリーよりルシフェラーゼをコードするc-DNA(2.0 Kb)を含有するプラスミドDNAを含有する大腸菌を得ることができる。

このようにして得られた微生物より純化された組み換え体DNAを得るには、例えば、「プロク・ナトル・アカド・サイ」(*Proc. Natl. Acad. Sci.*)、第62巻、第1159~1166頁(1969)記載の方法などにより得ることができる。

そして、上記の純化された新規な組み換え体DNAに、例えば、制限酵素BcoRI(宝酒造社製)2ユニットを温度30℃以上、好ましくは37℃にて1~4時間、好ましくは2時間作用させて部分消化させたのち、アガロースゲル電気泳動処理により、ルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼ遺伝子をすべて含有する2,000bpのDNA断片を単離することができる。

一方、このルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列の決定を実施例の項目18に示すような方法によって行ない第6図に示すルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列を得、次いで、前記塩基配列によって翻訳されるポリペプチドのアミノ酸配列を確定し、第7図に示される結果を得た。

このようにして確定されたアミノ酸配列をコードする遺伝子が本発明の1つである。

次いで、上記微生物を培地中で培養し、培養物よりルシフェラーゼを採取する。

培地としては、例えば、エッシェリシア属に属する微生物の培養に用いられるものであれば、如

何なるものでもよく、例えば、トリプトン1%(W/V)、酵母エキス0.5%(W/V)、NaCl 0.5%(W/V)及び1mMのイソプロビル-β-D-チオガラクトシド等が挙げられる。

また、培養温度は、例えば、30~40℃、好ましくは37℃程度で、培養時間は、例えば、4~8時間、好ましくは4時間程度である。

そして、培養物より菌体を例えば、8,000r.p.m.で10分間程度の遠心分離処理により集菌し、得られた菌体を、例えば、「メソズ・イン・エンザイモロジー」(*Methods in Enzymology*)第133巻、第3~14頁(1986)記載の方法により破砕し、粗酵素液を得る。

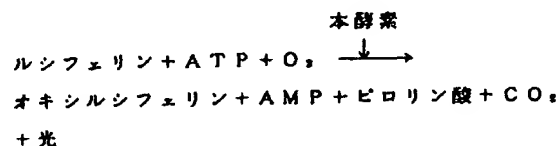
そして、粗酵素液は、そのままでも使用可能であるが、必要により硫酸分画、疎水クロマトグラフ法、(例えば、ブチルトリオパール650C等を用いる方法)、ゲル濾過法、(例えば、ウルトロゲルAcA34等による方法)により精製して、純化されたルシフェラーゼを得る。

このようにして得られたルシフェラーゼの理化

学的性質は、以下に示す通りである。

① 作用：

下記の酵素反応式で示されるように酵素分子によるルシフェリンの酸化を触媒する酵素である。



② 基質特異性：

ADP、CTP、UTP及びGTPには作用しない。

③ 至適 pH 及び安定 pH 範囲：

至適 pH は、ルシフェリンを基質とし、25mM グリシルグリシンの pH を pH 6.5 ~ 11.5 迄変化させ、温度 30℃ で反応させ、20 秒間発光量（フォトン数）を測定した場合、第 1 図に示す如く pH 7.5 ~ 9.5 であり、また安定 pH 範囲は、ルシフェリンを含有する緩衝液（pH 4.6 ~ 8.0 : 25mM リン酸緩衝液、pH 8.0 ~ 11.5 : 25mM グリシン・塩化ナトリウム - 水酸化ナトリウム緩衝液をそれぞれ使

80 μ l を注入すると同時に、ルミノメーター（アロカ社製、ルミネッセンスリーダ BSR-201）により発生するフォトン数を 20 秒間積算して求める。

④ 作用適温の範囲：

pH 7.8 のもとに、各温度で反応させ 20 秒間発光量（フォトン数）を測定した場合、0 ~ 50℃ の範囲内にある。

⑤ pH による失活の条件：

pH 5.0 以下及び pH 12.0 以上で 4 時間後完全に失活する。

（発明の効果）

上述したことから明らかな如く、本発明によれば、本発明のルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼ遺伝子の組み込まれた組み換え体 DNA を含むエッシャーシア菌に属する微生物を培地に培養することにより、極めて短期間のうちに、ルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼを効率よく製造することができるので、本発明は産業上極めて有用である。

用。なお、それぞれの緩衝液には 10% 飽和となる如く硫酸アンモニウムを添加したものである。）に酵素を添加し、温度 0℃ で 4 時間作用させた場合、第 2 図に示す如く、6.0 ~ 10.5 である。なお、第 2 図において、 \longrightarrow 及び \longleftarrow は、それぞれ 25mM リン酸緩衝液、及び 25mM グリシン・塩化ナトリウム - 水酸化ナトリウム緩衝液を使用した場合の活性を示す。

④ 力価の測定法：

25mM グリシルグリシン（pH 7.8）8 ml、硫酸マグネシウム溶液（25mM グリシルグリシン（pH 7.8）に硫酸マグネシウムを 0.1 M となる如く添加した溶液）0.5 ml 及びルシフェリン溶液（25mM グリシルグリシン（pH 7.8）にルシフェリンを 1 mM となる如く添加した溶液）0.8 ml を混合してルシフェリン混合液を調製する。

このようにして得たルシフェリン混合液 400 μ l 及び測定するルシフェラーゼ 10 μ l を混合したものに、ATP 溶液（25mM グリシルグリシン（pH 7.8）に ATP を 10 mM となる如く添加したもの。）

（実施例）

以下、本発明を実施例を挙げて更に詳細に説明する。

実施例

なお、以下に述べる項目 1 ~ 10 には、ホタルの 1 種であるフォティナス・ピラリスのルシフェラーゼをコードする遺伝子を含有する DNA（該 DNA は、ルシオラ・クルシアタのルシフェラーゼをコードする遺伝子を含有する DNA を検索する際、プローブとして使用されるものである。）の調製について述べ、また、以下の項目 11 ~ 13 には、ルシオラ・クルシアタ由来のルシフェラーゼをコードする遺伝子を含有する DNA（該 DNA は、ルシオラ・ラテラリスのルシフェラーゼをコードする遺伝子を含有する DNA を検索する際、プローブとして使用されるものである。）の調製について述べる。

1. m-RNA の調製

ホタルの 1 種であるフォティナス・ピラリス（Photinus pyralis）の乾燥尾部（シグマ社製）1

gを乳鉢及び乳棒を用いて充分破碎したものに、溶解緩衝液5ml〔20mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)/10mM NaCl/3mM 酢酸マグネシウム/5%(W/V) ショ糖/1.2%(V/V) トリトンX-100/10mMバナジルスクレオシド錯体(ニューイングランドバイオラボ社製)〕を添加し、更に、上記と同様に破碎してフォティナス・ピラリス尾部破碎物含有溶液を得た。

このようにして得た溶液5mlを、カップ型ブレンダー(日本精機製作所社製)に入れ、5,000r.p.m.で5分間処理したものに、12mlのグアニジンイソチオシアネート溶液(6Mグアニジンイソチオシアネート/37.5mMクエン酸ナトリウム(pH7.0)/0.75%(W/V) N-ラウロイルサルコシナトリウム/0.15M β -メルカプトエタノール)を添加し、更に、上記ブレンダーを用い3,000r.p.m.で10分間処理して得た溶液を、3重のガーゼを用いて濾過し、濾液を得、超遠心分離機用チューブ(日立工機社製)4本に、予め1.2mlの5.7Mの塩化セシウム溶液を夫々重層し、その上に、上記濾液を

重層するように夫々分注し、超遠心分離機(日立工機社製、SCP55H)を用いて温度15℃、30,000r.p.m.で16時間遠心分離して沈殿物を得た。

得られた沈殿物を、冷70%(V/V)エタノールを用いて洗浄したものを、10mMトリス緩衝液(10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)/5mMEDTA/1%ドデシル硫酸ナトリウム)4mlに懸濁したものに、同量のn-ブタノール及びクロロフォルムを4対1(容量比)となる如く混合したものを添加して抽出し、常法により3,000r.p.m.で10分間遠心分離し、水層及び有機溶媒層に分離し、この有機溶媒層に上記10mMトリス緩衝液4mlを添加し、上記抽出及び分離操作を行なう操作を2回繰り返して得られた水層に、1/10量の3M酢酸ナトリウム(pH5.2)及び2倍量の冷エタノールを添加したものを温度-20℃で2時間放置したのち、常法により8,000r.p.m.で20分間遠心分離し、RNAを沈殿させ、得られたRNAを4mlの水に溶解し、上記エタノール沈殿操作を行なったのち、得られたRNAを1mlの水に溶解し、3.75mgのRNAを

得た。

そして、以上の操作を再度繰り返すことにより合計7mgのRNAを調製し、このRNA中よりm-RNAを選択するために、7mgのRNAを、オリゴ(dT)-セルロース(ニューイングランドバイオラボ社製)カラムクロマトグラムにかけた。

カラムとして2.5mlテルモシリッジ(テルモ社製)を用い、樹脂0.5gは、溶出緩衝液〔10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.6)/1mMEDTA/0.1%(W/V)ドデシル硫酸ナトリウム〕で膨潤させたのち、カラムに充填し、結合緩衝液〔10mMトリス-塩酸(pH7.6)/1mMEDTA/0.4M NaCl/0.1%ドデシル硫酸ナトリウム〕で平衡化したものである。

7mgのRNAに、同量の緩衝液〔10mMトリス-塩酸(pH7.6)/1mMEDTA/0.8M NaCl/0.1%ドデシル硫酸ナトリウム〕を添加し、温度65℃で10分間加熱処理し、水中で急冷し、オリゴ(dT)-セルロースカラムにかけたのち、結合緩衝液で樹脂を洗浄し、未結合のr-RNA及びt-RN

Aを完全に洗浄し、更に、溶出緩衝液でm-RNAを溶出し、40 μ gのルシフェラーゼm-RNAを得た。

2. ルシフェラーゼm-RNAの濃縮

次に、ショ糖密度勾配遠心分離法によりルシフェラーゼm-RNAを濃縮した。

10~25%(W/V)のショ糖密度勾配は、ベックマン社製のローターSW41用ポリアロマトチューブに40%(W/V)ショ糖液〔50mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)/20mM NaCl/1mMEDTA/40%(W/V)ショ糖〕0.5mlを入れ、その上に2.4mlずつ25%(W/V)、20%(W/V)、15%(W/V)及び10%(W/V)のショ糖液を重層し、温度4℃で24時間放置することにより作製した。このショ糖密度勾配に、項目1.で得たm-RNA30 μ gを重層し、ベックマン社製のSW41ローターを用い、常法により30,000r.p.m.、温度18℃で18時間遠心分離を行なった。遠心分離操作ののち、0.5mlずつ分画し、エタノール沈澱法によりm-RNAを回収し、10 μ lの水に溶解した。

次に、m-RNAにコードされている蛋白質を調べるにより、ルシフェラーゼm-RNAが濃縮されている画分の同定を行なった。分画したRNA 1 μ l、ウサギ網状赤血球ライセート（アマシャム社製）9 μ l及び（ 35 S）メチオニン1 μ l（アマシャム社製）を混合し、温度30℃で30分間反応させたものに、150 μ lのNET緩衝液（150mM NaCl / 5mM EDTA / 0.02% (W/V) NaN₃ / 20mM トリス-塩酸緩衝液（pH 7.4） / 0.05% (W/V) ノニデット P-40（ベセスグリスサーチラボラトリー社製、界面活性剤））を添加し、更に、1 μ lの抗ルシフェラーゼ血清（後述のようにして調製したもの。）を添加し、温度4℃で18時間放置したものに、10 μ gのプロテインAセファロース（ファルマシア社製）を添加し、温度20℃で30分間放置したものを、常法により12,000r.p.m.で1分間遠心分離処理し、樹脂を回収した。

回収した樹脂を、200 μ lのNET緩衝液で3回洗浄し、この樹脂に、40 μ lのSDS-PAGE用サンプル緩衝液（62.5mM トリス-塩酸緩衝液

（pH 6.8） / 10% (V/V) グリセロール / 2% (W/V) ドデシル硫酸ナトリウム / 5% (V/V) メルカプトエタノール / 0.02% (W/V) ブロムフェノールブルー）を添加し、温度100℃で3分間煮沸し、常法により12,000r.p.m.で1分間遠心分離処理し、上清を回収し、全量を7.5% (W/V) ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲルに乗せた。

ゲル電気泳動は、ラエムリ（Laemmli）の方法（「ネイチャー」（Nature）、第227頁、第680頁（1970））で行ない、泳動したのちのゲルは、10% (V/V) の酢酸に30分間浸漬し、蛋白質を固定したのち、水に30分間浸漬し、更に、1M サリチル酸ナトリウム溶液に30分間浸漬し、乾燥して乾燥ゲルを得、X線フィルム（フジ写真フィルム社製、RX）を用いてフルオログラフィーを行なった。

以上の操作により、ルシフェラーゼm-RNAの存在する画分のRNAを用いた場合にのみ、ルシフェラーゼ蛋白質のバンドがX線フィルム上に認められ、ルシフェラーゼm-RNAの濃縮されている画分が固定できた。

3. 抗血清の調製

精製ルシフェラーゼに対するウサギの抗ルシフェラーゼ血清は、以下の方法により調製した。

3.2 mg / ml 濃度のルシフェラーゼ溶液（シグマ社製ルシフェラーゼを0.5 M グリシルグリシン溶液（pH 7.8）に溶解したもの）0.7 mlを、等量のフレンド（Freund）完全アジュバントで懸濁したものを、2.24 mgを、抗原として体重2 kgの日本白色種ウサギの指掌部に投与し、飼育2週間経過したのち、初回と同量の抗原を背部皮内へ投与し、更に、飼育1週間経過したのち、同様の操作を行ない、また更に、飼育1週間後全採血を行なった。

そして、得られた血液を、温度4℃で18時間放置したものを、常法により3,000r.p.m.で15分間遠心分離し、上清として抗ルシフェラーゼ血清を得た。

4. c-DNAの合成

c-DNAの合成は、アマシャム社製キットを用いて行なったものである。

上述の如くして得られたm-RNA 2 μ gを用

いてアマシャム社の指示する「モル・セル・バイオル」（Mol. Cell Biol.）、第2巻、第161頁（1982）及び「ジーン」（Gene）、第25巻、第263頁（1983）記載の方法に従い行なった結果、300ngの2本鎖c-DNAが得られた。

このc-DNA 150ngを、7 μ lのTE緩衝液（10mM トリス-塩酸緩衝液（pH 7.5） / 1mM EDTA）に溶解したものに、11 μ lの混液（280mM カコジル酸ナトリウム（pH 6.8） / 60mM トリス-塩酸緩衝液（pH 6.8） / 2mM 塩化コバルト）及び3.8 μ lのティリング混液（10mM ジチオスレイトール 7.5 μ l / 10ng / ml ポリ（poly）A 1 μ l / 5mM dCTP 2 μ l / 水110 μ l）を夫々添加し、更に、29ユニットのターミナルトランスフェラーゼ（ベーリンガー・マンハイム社製）を添加し、温度30℃で10分間反応させたのち、2.4 μ lの0.25M EDTA及び2.4 μ lの10% (W/V) ドデシル硫酸ナトリウムを夫々添加して反応を停止させた。

反応停止液に25 μ lの水飽和フェノールを用いて除蛋白処理を行なったのち、回収した水層に、

25 μ l の 4 M 酢酸アンモニウム及び 100 μ l の冷エタノールを夫々添加し、温度 -70°C で 15 分間放置し、12,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離して c-DNA を回収し、10 μ l の TE 緩衝液に溶解し、c-DNA 溶解液を得た。

以上の如くしてデオキシシチジンのテイルの付いた c-DNA 100 ng を得た。

5. ベクターに使用する組み換え体プラスミド pMCE10 DNA の調製

大腸菌 W3110 株 (ATCC 27325)、プラスミド pBR325 DNA (BRL 社製) 及びプラスミド pBR322 DNA (宝酒造社製) を用いてティー・マズグ等 (T. Maeda et al.) 「アグリカルチュラル・バイオロジカル・ケミストリー」 (Agricultural Biological Chemistry)、第 50 巻、第 271~279 頁 (1986) 記載の方法により作製したプラスミド pKN305 DNA 並びにプラスミド pMC1403-3 DNA (特開昭 61-274683 号公報記載) 夫々 1 μ g を、10 μ l の混液 (50 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 7.5) / 10 mM MgCl₂ / 100 mM NaCl / 1 mM ジチオスレイトール) に添加し、更に、これに、HindIII 及び SalI (いずれも宝酒造社製) を夫々 2 ユニットずつ添加し、温度 37°C で 1 時間反応させて切断処理し、常法によるフェノール抽出及びエタノール沈澱処理を行ない沈澱物を得た。この沈澱物を、10 μ l のライゲーション緩衝液 (20 mM MgCl₂ / 66 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 7.6) / 1 mM ATP / 15 mM ジチオスレイトール) に溶解し、溶液を得、更に、1 ユニットの T4 DNA リガーゼ (宝酒造社製) を添加し、温度 20°C で 4 時間連結反応を行なった。次いで、この反応液を用い、「ジェイ・バクテリオロジー」 (J. Bacteriology、第 119 巻、第 1072 頁~第 1074 頁 (1974 年)) 記載の形質転換法により、大腸菌 JM101 (ATCC 33876) 株を形質転換し、薬剤耐性 (アンピシリン耐性及びテトラサイクリン感受性) 及び β -ガラクトシダーゼ活性を検討し、形質転換株を得、その株の含有する組み換え体プラスミド DNA を pMCE10 と命名した。この組み換え体プラスミド pMCE10 DNA を含有する大腸菌 JM101 株を、トリプトン 1% (W/V)、

酵母エキス 0.5% (W/V)、及び NaCl 0.5% (W/V) からなる培地 1 l に、該培地を用い温度 37°C で 16~24 時間前培養して得た大腸菌 JM101 (pMCE10) の培養液 20 ml を接種し、温度 37°C で 3 時間振盪培養したのち、0.2 g のクロラムフェニコールを添加し、更に同一温度で 20 時間同培養を行ない、培養液を得た。

次いで、この培養液を、常法により 6,000 r.p.m. で 10 分間遠心分離して湿潤菌体 2 g を得、これを 20 ml の 25% (W/V) ショ糖を含有する 350 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁したのち、更に、これに、リゾチーム 10 mg、0.25 M EDTA 溶液 (pH 8.0) 8 ml 及び 20% (W/V) ドデシル硫酸ナトリウム溶液 8 ml を夫々添加し、温度 60°C で 30 分間保温して溶菌し、溶菌液を得た。

この溶菌液に、5 M NaCl 溶液 13 ml を添加し、温度 4°C で 16 時間処理したものを常法により 15,000 r.p.m. で 30 分間遠心分離して抽出液を得、常法によりフェノール抽出処理及びエタノール沈澱処理を行ない沈澱物を得た。

次いで、この沈澱物を、通常の減圧乾燥処理したものを、1 M EDTA を含有する 10 mM トリスー塩酸緩衝液 6 ml (pH 7.5) に溶解し、更に、これに、塩化セシウム 6 g 及びエチジウムブロマイド溶液 (10 mg/ml) 0.2 ml を添加したものを、常法により 39,000 r.p.m. で 42 時間超遠心分離機を用いて平衡密度勾配遠心分離処理を行ない、組み換え体プラスミド pMCE10 DNA を単離し、また更に、n-ブタノールを使用してエチジウムブロマイドを除去したのち、1 M EDTA を含有する 10 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 7.5) に対して透析を行ない純化された組み換え体プラスミド pMCE10 DNA 500 μ g を得た。

6. ベクター DNA の調製

以上の様にして得られた組み換え体プラスミド pMCE10 DNA 15 μ g を、90 μ l の項目 4 記載の TE 緩衝液に溶解し、10 μ l の Med 緩衝液 (100 mM トリスー塩酸緩衝液 (pH 7.5) / 100 mM MgCl₂ / 10 mM ジチオスレイトール / 500 mM NaCl) を添加したのち 30 ユニットの制限酵素 AccI (宝酒造社製)

を更に加え、温度37℃で1時間切断処理を行ない切断処理物を得た。この切断処理物に、100 μ lの水飽和フェノールを加え除蛋白操作を行なったのち、水層を回収し、これに、1/10量の3 M酢酸ナトリウム(pH 7.5)及び2倍量の冷エタノールを加え、温度-70℃で15分間放置したのち、12,000 r.p.m.で10分間遠心分離し、DNAを回収した。

このDNAを、10 μ lのTE緩衝液に溶かし、15 μ lの混液(280mM カコジル酸ナトリウム(pH 6.8)/60mM トリス-塩酸緩衝液(pH 6.8)/2mM 塩化コバルト)を加えたのち、更に、5 μ lのティリング混液(項目4記載)(5mM dCTPを用いた)を加え、また更に、5ユニットのターミナルトランスフェラーゼ(宝酒造社製)を添加し、温度37℃で15分間反応させた。項目4記載のc-DNA ティリング反応と同様の後処理を行なうことにより組み換え体プラスミド pMC E10 DNAのAcc Iサイトにデオキシグアノシンのテイルが付いたDNAを調製した。

一方、下記のようにしてプラスミド pUC19 D

NAのPst Iサイトにデオキシグアノシンのテイルが付いたDNAの調製も同時に行なった。

プラスミド pUC19 DNA(宝酒造社製)30 μ gを、350 μ lのTE緩衝液に溶解したものに、40 μ lのMed緩衝液及び制限酵素Pst I(宝酒造社製)120ユニットを夫々添加し、温度37℃で1時間切断処理したのち、常法によりフェノールによる除蛋白処理及びエタノール沈殿処理によりDNAを回収した。

得られたDNAを、35 μ lのTE緩衝液に溶解したものに、50 μ lの混液(280mM カコジル酸ナトリウム(pH 6.8)/60mM トリス-塩酸緩衝液(pH 6.8)/1mM 塩化コバルト)、19 μ lの項目4記載のティリング混液(dCTP含有)並びに60ユニットのターミナルトランスフェラーゼ(宝酒造社製)を夫々添加し、温度37℃で10分間反応させたのち、常法によりフェノール処理及びエタノール沈殿を行なうことにより目的のDNAを回収した。

7. アニール及び形質転換

上記配合したc-DNA 15ng及びベクターDN

A 200ngを、35 μ lのアニール緩衝液(10mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.5)/100mM NaCl/1mM EDTA)に溶解し、温度65℃で2分間、温度46℃で2時間、温度37℃で1時間及び温度20℃で18時間放置する操作によりc-DNAとベクターDNAをアニールした。

アニールしたDNAを用いて、ハナハン(Hanahan)の方法(「デー・エヌ・エイ クローニング」(DNA Cloning)、第1巻、第109~135頁(1985))により大腸菌DH1株(ATCC 33849)を形質転換し、プラスミド pUC19 DNA及び組み換え体プラスミド pMC E10 DNAをベクターとしたc-DNAバンクを夫々作製した。

8. ルシフェラーゼc-DNAの検索

組み換え体プラスミド pMC E10 DNAのAcc I部位は、大腸菌 β -ガラクトシダーゼ遺伝子をコードする部位にあるので、この部位に組み込まれたc-DNAは β -ガラクトシダーゼとの融合蛋白質を作る。また組み換え体プラスミド pMC E10の β -ガラクトシダーゼ遺伝子のプロモータ

ーは前述した様に大腸菌トリプトファン遺伝子のプロモーターに変換してある。

組み換え体プラスミド pMC E10 DNAを、ベクターとするc-DNAバンクのコロニー96個を10mlのM9カザミノ酸培地(「モレキュラー・クローニング」(Molecular Cloning)、第440~441頁、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)(1982))にチアミン(10 μ g/ml)を加えた培地を用い温度37℃で10時間振盪培養し、常法により集菌したのち、200 μ lの項目2記載のSDS-PAGE用サンプル緩衝液に懸濁し、温度100℃で5分間煮沸した。

この懸濁液40 μ lを、7.5%(W/V)ポリアクリルアミドゲルを用いて、常法により電気泳動を行なった。泳動終了後、ゲルに展開した蛋白質を、ウエスタンブロット法(「アナリ・バイオケム」(Anal. Biochem.)、第112巻、第195頁(1981))によりニトロセルロースのフィルターに転写し、このニトロセルロースフィルターをイミューンブロッ

トアッセイキット（バイオラッド社製）を用いて抗ルシフェラーゼ血清で染色した。方法は、バイオラッド社の操作法に従った。

即ちニトロセルロースのフィルターを、100 μ lのブロッキング溶液〔TBS緩衝液（20mM トリス-塩酸緩衝液/500mM NaCl (pH 7.5)）に3% (W/V) のゼラチンを溶かした溶液〕中温度25℃で、30分間振盪した。次に、このニトロセルロースフィルターを25 μ lの一次抗体溶液（ルシフェラーゼ抗血清を1% (W/V) のゼラチンをTBS緩衝液に溶かした溶液で25倍 (V/V) に希釈した溶液）に移し、温度25℃で90分間振盪したものを、100 μ lの Tween-20洗液（TBS緩衝液に0.05% (W/V) の Tween-20 を溶かした溶液）中に移し、温度25℃で10分間振盪する操作を2回行った。次いで、このようにして得たニトロセルロースフィルターを60 μ lの二次抗体溶液（西洋ワサビペルオキシダーゼで標識した抗ウサギ抗体（バイオ・ラッド社製）を1% (W/V) のゼラチンをTBS緩衝液に溶かした溶液で3000倍 (V/V) に

希釈した溶液）中に移し、温度25℃で60分間振盪したのち、100 μ lの Tween-20洗液でニトロセルロースフィルターを洗う上記操作を2回繰り返す、このようにして得たニトロセルロースフィルターを、120 μ lの発色液（60 μ gの4-クロロ-1-ナフトールを20 μ lの冷メタノールに溶解した溶液及び60 μ lの30% (V/V) 過酸化水素水を100 μ lのTBS緩衝液に添加した溶液を混合した溶液）中に移し、温度25℃で10分間発色させた。

この様にして96個のコロニーを1グループとして4グループについて同様の方法を行なったところ、2つのグループでルシフェラーゼ抗血清で染まる蛋白質バンドが認められた。次に、この2つのグループに属する96個のコロニーを12個のコロニーずつ8グループに分け同様の操作を行なったところ夫々1グループに抗ルシフェラーゼ血清と反応する蛋白質が認められた。最後に、このグループに含まれる12個のコロニーを、1個のコロニーずつ同様の操作を行ないルシフェラーゼ抗血清と反応する蛋白質を作るコロニーを同定した。以

上の操作によりルシフェラーゼc-DNAをもつ2個のコロニーが得られた。この2個のコロニーより項目5記載の方法でプラスミドDNAを調製した。得られた組み換え体プラスミドDNAは、pALf2B8 DNA及びpALf3A6 DNAと夫々命名した。

9. 大きなルシフェラーゼc-DNAの検索-DNAのプロープの作製

組み換え体プラスミドpALf3A6 DNA 100 μ gを、330 μ lのTE緩衝液に溶解し、これに40 μ lのLow緩衝液（100mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) / 100mM MgCl₂ / 10mM ジチオスレイトール）、130ユニットのPst I（宝酒造社製）及び120ユニットのSac I（ベーリンガー・マンハイム社製）を添加し、温度37℃で1.5時間切断した。

このDNA全量を0.7% (W/V) アガロースゲルを用いた電気泳動で分離した。アガロースゲル電気泳動はティー・マニアテス (T. Maniatis) 等の方法（「モレキュラー・クローニング」 (Molecular Cloning)、第156～161頁、コールド・スプリング

・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory) (1984)）に従って行なった。ルシフェラーゼc-DNAを含むDNAバンドを切り出し、透析チューブに入れ、2 μ lのTE緩衝液を加えたのち、透析チューブをシールし、電気泳動により、ゲル中より緩衝液中にDNAを溶出した。この溶液に等容量の水飽和フェノールを加え、攪拌したのち、水層を回収し、上方に従いエタノール沈澱によりDNAを回収した。

得られたDNAフラグメント10 μ gを、126 μ lのTE緩衝液に溶かし、16 μ lのMed緩衝液及び64ユニットのSau3A I（宝酒造社製）を加え、温度37℃で2時間反応させたのち、全量を5% (W/V) ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により、DNA断片の分離を行なった。ポリアクリルアミドゲル電気泳動は、エイ・マクサム (A. Maxam) の方法（「メソズ・イン・エンザイモロジー」 (Methods in Enzymology)、第65巻、第506頁 (1980)）に従って行なった。190bpのDNAフラグメントを前述と同様の方法で単離し、1 μ gのS

au3' A I ルシフェラーゼ c-DNA フラグメントが得られた。

この 1 μ g のルシフェラーゼ c-DNA を、(α - 32 P) dCTP (アマシャム社製) を用いてニックトランスレーション法により標識した。ニックトランスレーションは宝酒造社製のキットを用い、宝酒造社の指示する「ジェイ・モル・バイオル」(J.Mol.Biol.)、第113巻、第237~251頁(1977)及び「モレキュラー・クローニング」(Molecular Cloning)、第109~112頁、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー (Cold Spring Harbor Laboratory)(1982)記載の方法に従って行なった。

10. 大きなルシフェラーゼ c-DNA の検索-コロニーハイブリダイゼーション

前述の方法で調製した 32 Pで標識したルシフェラーゼ c-DNA 断片を、プローブとして用い、組み換え体プラスミド pUC19 DNA をベクターとするフォティナス・ピラリス尾部 c-DNA バンクを、コロニーハイブリダイゼーション法

11. ルシオラ・クルシアタ (Luciola Crucjata) の m-RNA の調製

生きたルシオラ・クルシアタ (ゲンジボタル・株式会社・西武百貨店より購入) 10g を超低温冷凍庫に入れ、凍結し、はさみを用いて尾部を切り離し、得られた尾部 2g に、18ml のグアニジンイソチオシアネート溶液を添加し、項目1記載の方法に従って 1.1mg の RNA を調製した。この RNA 1.1mg を項目1記載の方法に従ってオリゴ(dT)-セルロースのカラムクロマトグラフィーを行ない 30 μ g のルシオラ・クルシアタ尾部 m-RNA を調製した。

12. ルシオラ・クルシアタ尾部 c-DNA バンクの作製

c-DNA の合成はアマシャム社より購入したキットを用い、アマシャム社の指示する「モル・セル・バイオル」(Mol.Cell Biol.)、第2巻、第161頁(1982)及びジーン(Gene)、第25巻、第263頁(1983)記載の方法に従って合成した。

2 μ g のルシオラ・クルシアタ尾部 RNA より

(「蛋白質・核酸・酵素」第26巻、第575~579頁(1981)) で検索し、ルシフェラーゼ c-DNA を有するコロニーを得た。そのうちの1個のコロニーの有する組み換え体プラスミド DNA を pAL f3 と命名し、項目5記載の方法でプラスミド DNA を調製した。該組み換え体プラスミド DNA を含有する大腸菌を大腸菌 DH1 (pAL f3) と命名した。なお、該形質転換株は ATCC 67462 として寄託されている。

そして、上記組み換え体プラスミド pAL f3 DNA を、XbaI、HindIII、BamHI、EcoRI 及び PstI (いずれも宝酒造社製) を用い、単一消化及び2重消化して得られた DNA 断片をアガロースゲル電気泳動法により移動度パターンを分析し、得られた移動度パターンと λ DNA (宝酒造社製) を HindIII により消化して得られた DNA 断片の標準移動度パターンと対比することにより得られた分子量は、1,700bp であり、上記プラスミドの制限酵素地図は、第3図に示すとおりであった。

0.9 μ g の二本鎖 c-DNA が合成された。この c-DNA 0.3 μ g に項目4記載の方法を用いてポリデオキシシチジンのテイルを付加した。

この c-DNA 20ng 及び項目6で調製したポリグアノシンのテイルをその PstI 部位に付加した pUC19 プラスミド DNA 500ng を、項目7記載の方法でアニールし、ハナハン(Hanahan)の方法(「ディエヌエイ・クローニング」(DNA Cloning)、第1巻、第109~135頁(1985))に従ってアニールした DNA により大腸菌 DH1 株 (ATCC 33849) を形質転換しルシオラ・クルシアタ尾部 c-DNA バンクを作製した。

13. ルシオラ・クルシアタ由来のルシフェラーゼ c-DNA の検索

項目10で得られた組み換え体プラスミド pAL f3 DNA 10 μ g を、90 μ l の TBE 緩衝液に溶解し、10 μ l の Med 緩衝液、25ユニットの制限酵素 EcoRI 及び25ユニットの制限酵素の ClaI (いずれも宝酒造社製) を添加し、温度37℃で2時間反応を行ない DNA を切断した。切断した組み換

え体プラスミド pAL13 DNAよりフォテナス・ピラリス (アメリカホタル) 由来のルシフェラーゼ c-DNA 部分を含む 800bp の EcoRI/ClaI DNA フラグメントを、項目9記載のアガロースゲル電気泳動法を用いる方法に従って単離し、1 μ g の EcoRI/ClaI DNA フラグメントを得た。この1 μ g の DNA を、(α - 32 P) dCTP 三塩酸 (アマシャム社製) を用いて項目9記載のニックトランスレーション法により 32 P で標識した。 32 P で標識した EcoRI/ClaI DNA フラグメントをプローブとして、ルシオラ・クルシアタ尾部 c-DNA バンクを項目10記載のコロニーハイブリダイゼーション法で検索することによりルシオラ・クルシアタ由来のルシフェラーゼ c-DNA を有する大腸菌を選択した。プローブとハイブリダイズする大腸菌コロニーを数個得た。この中の1コロニーの有するプラスミド DNA を pGL1 と命名し、項目5記載の方法に従い組み換え体プラスミド DNA を単離した。

この組み換え体プラスミド pGL1 DNA を Hpa

6 μ g のルシオラ・ラテラリス尾部 m-RNA を調製した。

15. ルシオラ・ラテラリス尾部 c-DNA バンクの作製

c-DNA の合成は、アマシャム社製キットを用いて行なったものである。

上述の如くして得られた m-RNA 2.0 μ g を用いてアマシャム社の指示する「モル・セル・バイオル」(Mol. Cell. Biol.)、第2巻、第161頁(1982)及びジーン (Gene)、第25巻、第263頁(1983)記載の方法に従い行なった結果、250ng の2本鎖 c-DNA が得られた。

このようにして得た c-DNA 250ng に、アマシャム社製 c-DNA クローニングキットを用い、アマシャム社の指示する方法により制限酵素 EcoRI 切断部位のメチル化を行ない、更に c-DNA の両端に EcoRI リンカーを付着させた。

プラスミド pUC119 DNA (宝酒造社製) 100ng を、8 μ l の水に溶解したものに、1 μ l の Med 緩衝液 (100mM トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5) 100mM

1, HindIII, EcoRV, DraI, AflII, HincII, PstI (いずれも宝酒造社製) 及 SapI (ニューイングランドバイオラボ社製) を用い、単一消化及び二重消化して得られた DNA 断片をアガロースゲル電気泳動法により、移動度パターンを分析し、得られた移動度パターンと λ ファージ DNA (宝酒造社製) を HindIII により消化して得られた DNA 断片の標準移動度パターンとを対比することにより得られた分子量は、2,000bp であり、上記プラスミドの制限酵素地図は、第4図に示す通りである。

14. ルシオラ・ラテラリスの m-RNA の調製

生きたルシオラ・ラテラリス (ヘイケボタル・川原島獣貿易より購入) 5g を超低温冷凍庫に入れ、凍結し、はさみを用いて尾部を切り離し、得られた尾部 1g に、18ml のグアニジンイソチオシアネート溶液を添加し、項目1記載の方法に従って 340 μ g の RNA を調製した。この RNA 340 μ g を項目1記載の方法に従ってオリゴ(dT)-セルロースのカラムクロマトグラフィーを行ない

ngCl₂ / 10mM ジチオスレイトール / 500mM NaCl) を添加したのち、更に、これに、10ユニット (1 μ l) の制限酵素 EcoRI (宝酒造社製) を添加し、温度 37℃ で1時間切断処理を行なった。

次いで、この切断処理物に、1 μ l の 1M トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) 及び 0.3 ユニット (1 μ l) のアルカリフォスファターゼ (宝酒造社製) を添加し、温度 65℃ で1時間酵素反応処理し、切断処理物の両端の脱リン酸化を行ない、これに、12 μ l の水飽和フェノールを添加して除蛋白を行なったのち、回収した水層に、1 μ l の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.8) 及び 26 μ l の冷エタノールを夫々添加し、温度 -70℃ で15分間放置し、微量遠心機 (錦トミー精工、MRX-150) を用い、12,000 r.p.m. で5分間遠心分離処理を行ない DNA を回収した。

このようにして得られた制限酵素 EcoRI で切断し、かつ両端を脱リン酸化したプラスミドベクター pUC119 DNA 100ng と、項目15で調製した c-DNA 250ng を混合したものを、8 μ l の

水に懸濁したのち、これに、1 μ l の $\times 10$ ライゲーション緩衝液 (200mM MgCl₂/660mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6)/10mM ATP/150mM ジチオスレトール) を添加したものに、1 ユニット (1 μ l) の T4 DNA リガーゼ (宝酒造社製) を添加し、温度 16°C で 16 時間放置し、プラスミドベクター DNA 及び c-DNA のライゲーションを行ない反応物を得た。

この反応物を用いて、ハナハン (Hanahan) の方法 (「ディーエヌエイ・クローニング」 (DNA Cloning)、第 1 巻、第 109~135 頁 (1985)) により大腸菌 DH 1 株 (ATCC 33849) を形質転換し、プラスミド pUC119 DNA をベクターとしたルシオラ・ラテラリス尾部由来の c-DNA バンクを作製した。

16. ルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼ c-DNA の検索

項目 13 で得られた組み換え体プラスミド pGL1 DNA 10 μ g を、90 μ l の TE 緩衝液に溶解し、10 μ l の Med 緩衝液、25 ユニットの制限酵素

Pst I (宝酒造社製) を添加し、温度 37°C で 2 時間反応を行ない DNA を切断した。切断した組み換え体プラスミド pGL1 DNA よりルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼ c-DNA 部分を含む 2,000bp の Pst I DNA フラグメントを、項目 9 記載のアガロースゲル電気泳動法を用いる方法に従って単離し、1 μ g の Pst I DNA フラグメントを得た。この 1 μ g の DNA を、(α -³²P) dCTP (アマシャム社製) を用いて項目 9 記載のニックトランスレーション法により ³²P で標識した。³²P で標識した Pst I DNA フラグメントをプローブとして、ルシオラ・ラテラリス尾部 c-DNA バンクを項目 10 記載のコロニーハイブリダイゼーション法で検索することによりルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼ c-DNA を有する大腸菌を選択した。プローブとハイブリダイズする大腸菌コロニーを数個得た。この中の 1 コロニーの有するプラスミド DNA を pH L17 と命名し、項目 5 記載の方法に従い組み換え体プラスミド DNA を単離した。

なお、このようにして得られた大腸菌 (E. coli) DH 1 (pH L17) は、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研条寄第 1917 号 (FERM BP-1917) として寄託されている。

上記組み換え体プラスミド pH L17 DNA を HpaI, EcoR V, ApaI, Hind III 及び EcoR I (いずれも宝酒造社製) 及び SapI (ニューイングランドバイオラボ社製) を用い、単一消化及び二重消化して得られた DNA 断片をアガロースゲル電気泳動法により、移動度パターンを分析し、得られた移動度パターンと λ ファージ DNA (宝酒造社製) を Hind III により消化して得られた DNA 断片の標準移動度パターンとを対比することにより得られたルシオラ・ラテラリスのルシフェラーゼをコードする遺伝子の分子量は、2,000bp であり、上記プラスミドの制限酵素地図は、第 5 図に示す通りである。

そして、上記組み換え体プラスミド pH L17 DNA 10 μ g を、45 μ l の TE 緩衝液に溶解したものに、5 μ l の Med 緩衝液及び 2 ユニットの制

限酵素 EcoR I (宝酒造社製) を夫々添加し、温度 37°C で 2 時間反応を行ない、DNA の部分消化物を得た。

次いで、この部分消化物を、項目 9 記載のアガロースゲル電気泳動法に従い、ルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼ遺伝子をすべて含有する 2,000bp の EcoR I 断片 1 μ g を単離した。

17. 大腸菌 (E. coli) DH 1 (pH L17) (FERM BP-1917) の培養及び粗酵素液の調製

大腸菌 (E. coli) DH 1 (pH L17) (FERM BP-1917) を、LB-amp 培地 (バクトトリプトン 1% (W/V), 酵母エキス 0.5% (W/V), NaCl 0.5% (W/V), 及びアンピシリン (50 μ g/ml)) 3 ml にて温度 37°C で 18 時間振盪培養を行なった。この培養液 0.5 ml を 10 ml の上記 LB-amp 培地に接種し、更に、これに、1 mM のイソプロピル β -D-チオガラクトシドを添加し、温度 37°C で 4 時間振盪培養したのち、8,000 r.p.m. で 10 分間の遠心分離操作により湿潤菌体 20 mg を得た。

回収した菌体を、0.1 M KH₂PO₄ (pH 7.8)、2 mM

EDTA、1 mMジチオスレイトール及び0.2 mg/mlプロタミン硫酸からなる緩衝液0.9 mlに懸濁し、更に、これに、100 μ lの10 mg/mlのリゾチーム溶液を添加し、水中に15分間放置した。次に、この懸濁液を、メタノール・ドライアイス浴中で凍結し、続いて温度25℃に放置し、完全に解凍した。更に、12,000 r.p.m.で5分間遠心分離操作を行なうことにより上清として粗酵素液1 mlを得た。

このようにして得られた粗酵素液中のルシフェラーゼ活性の測定は、下記記載の方法により行ない、その結果を第1表に示した。

得られた粗酵素液中のルシフェラーゼ活性の測定は、クリッカ(Kricka)等の方法〔「フチーブス・オブ・バイオケミストリー・アンド・バイオフィジクス」(Archives of Biochemistry and Biophysics)、第217巻、第674頁(1982)〕に従って生成するフォトン数を計測することにより行なった。

すなわち、260 μ lの25 mMグリシルグリシン緩衝液(pH 7.8)、16 μ lの0.1 M硫酸マグネシウム、

24 μ lの1 mMルシフェリン(シグマ社製)及び10 μ lの粗酵素液を混合したのち、100 μ lの20 mM ATPを添加し、発生するフォトン数を20秒間積算した値を第1表に示した。

また、比較のため、プラスミド pUC119 DNAを有する大腸菌DH1株(大腸菌DH1(pUC119))についても同様にルシフェラーゼ活性を測定し、その結果を第1表に示した。

第1表

試料	項目	フォトン数/ml培養液
大腸菌DH1 (pHLf7)		6.2×10^4
大腸菌DH1 (pUC119) (対照)		1.0×10^4

上表より明らかな如く、本発明のルシフェラーゼ遺伝子を含む組み換えプラスミド pHL57を含む大腸菌DH1(pHLf7)は、対照に比し、フォトン数が増加しているため、大腸菌菌体中にルシフェラーゼが生産されていることが判明した。

18. ルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼ c-DNAの塩基配列の解析

組み換え体プラスミド pHLf7 DNA 10 μ gを制限酵素EcoRI(宝酒造社製)で切断し、ルシフェラーゼ c-DNAを含む1.7 Kb及び0.3 KbのDNA断片を夫々2.0 μ g及び0.5 μ gずつ得、これらDNA断片を、プラスミド pUC118 DNA(宝酒造社製)のEcoRI部位にサブクローニングし、挿入断片の種類(1.7 Kb及び0.3 Kb)及び挿入方向の違いにより4種類のプラスミド、pHLf11、pHLf12、pHLf13及びpHLf14を夫々得た(pHLf11及びpHLf12には、1.7 Kbの断片がサブクローニングされており、pHLf13及びpHLf14には0.3 Kbの断片がサブクローニングされている。)

組み換え体プラスミド pHLf7 DNA及びプラスミド pUC118 DNAのEcoRIによる切断処理(項目6記載の方法)、ルシフェラーゼ c-DNA断片のアガロースゲル電気泳動法を用いた単離(項目9記載の方法)、プラスミド pUC119

DNA及びルシフェラーゼ c-DNA断片の連結反応(項目5記載の方法)、連結反応液を用いた大腸菌JM101株(ATCC33876)の形質転換(項目5記載の方法)、並びに組み換え体プラスミド pHLf11、pHLf12、pHLf13及びpHLf14 DNAの調製(項目5記載の方法)は、カッコ内記載の方法に従った。

次いで、組み換え体DNA、pHLf11、pHLf12、pHLf13及びpHLf14 DNAを用いてキロシークエンス用欠失キット(宝酒造社製)を用い、ヘニコフ(Henikoff)の方法〔ジーン(Gene)、第28巻、第351~359頁(1984)〕に従いルシフェラーゼ c-DNAに種々の欠失が導入されたプラスミド DNAを作製し、項目5記載の方法で大腸菌JM101株(ATCC33876)に導入した。このようにして得られた大腸菌にペルパーフェージM13KO7(宝酒造社製)を感染させることによりメッシング(Messing)の方法(メソズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology)、第101巻、第20~78頁(1983))に従って1本鎖DNAを調製

した。得られた1本鎖DNAによるシーケンシングは、M13シーケンシングキット（宝酒造社製）を用いて上記メッシング（Messing）の方法に従って行なった。塩基配列の解析のためのゲル電気泳動は8% (W/V) ポリアクリルアミドゲル（富士写真フィルム社製）を用いて行なった。得られたルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼ c-DNA の塩基配列を第6図に、また該 c-DNA から翻訳されるポリペプチドのアミノ酸配列を第7図に c-DNA とアミノ酸配列とが対応した配列を第8図に夫々示した。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、ルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼの至適 pH 域を示す図であり、第2図は、ルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼの安定 pH を示す図であり、第3図は、組み換え体プラスミド pAL13 DNA の制限酵素による切断地図を示す図であり、第4図は、組み換え体プラスミド pGL11 DNA の制限酵素による切断地図を示す図であり、第5図は、組み換え体プラス

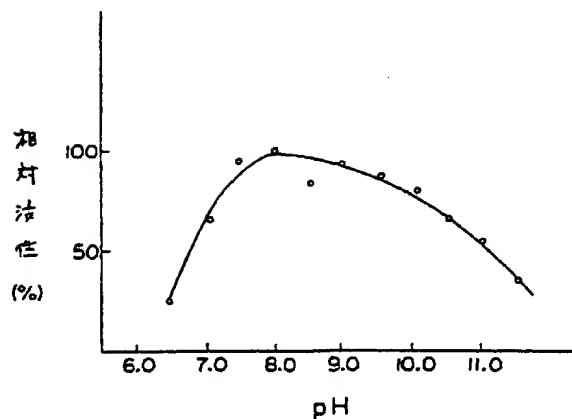
ミド pHL17 DNA の制限酵素による切断地図を示す図であり、第6図は、本発明のルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列を示す図であり、また、第7図は、本発明のルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼ遺伝子から翻訳されるポリペプチドのアミノ酸配列を示す図であり、第8図は、ルシオラ・ラテラリス由来のルシフェラーゼ遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列とが対応した配列を示す図である。

出願人 キッコーマン株式会社

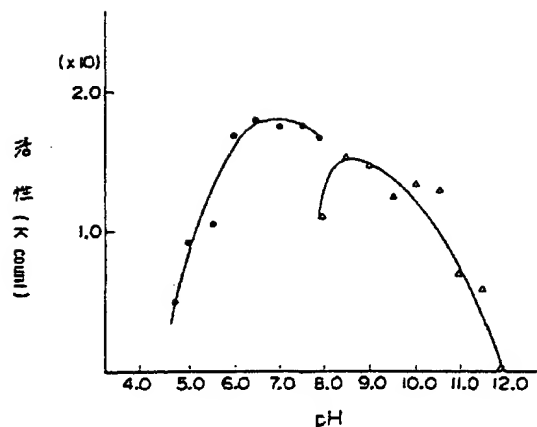
代理人 弁理士 平 木 祐 輔

同 弁理士 石 井 貞 次

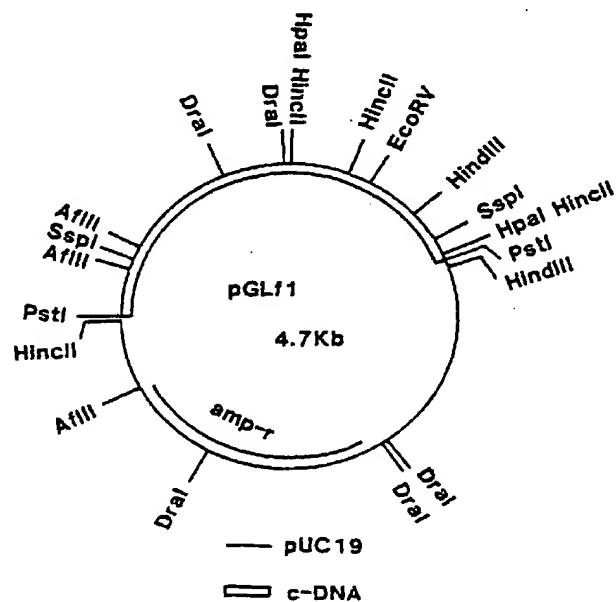
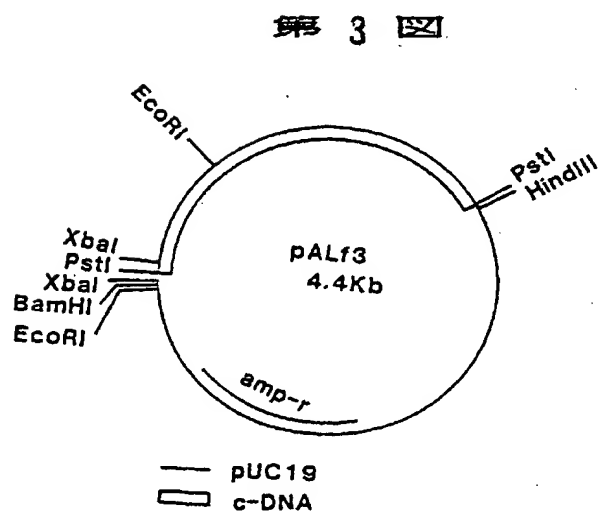
第 1 図



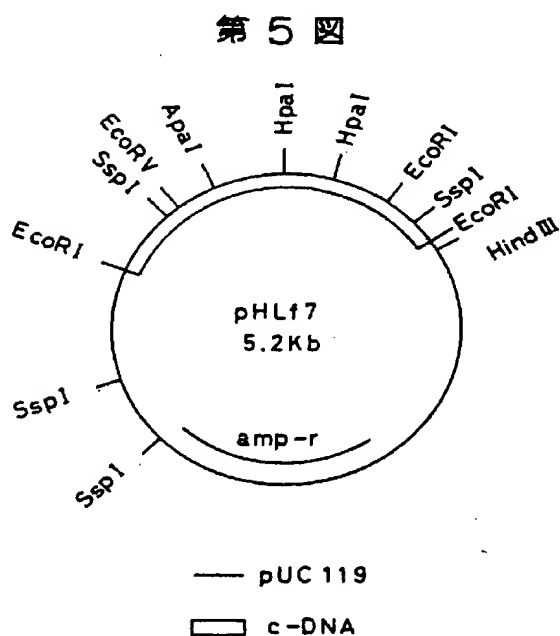
第 2 図



第 4 図



第 6 図 (その 1)



```

ATG GAA AAC ATG GAG AAC GAT GAA AAT ATT
GTG TAT GGT CCT GAA CCA TTT TAC CCT ATT
GAA GAG GGA TCT GCT GGA GCA CAA TTG CGC
AAG TAT ATG GAT CGA TAT GCA AAA CTT GGA
GCA ATT GCT TTT ACT AAC GCA CTT ACC GGT
GTC GAT TAT ACG TAC GCC GAA TAC TTA GAA
AAA TCA TGC TGT CTA GGA GAG GCT TTA AAG
AAT TAT GGT TTG GTT GTT GAT GGA AGA ATT
GCG TTA TGC AGT GAA AAC TGT GAA GAA TTC
TTT ATT CCT GTA TTA GCC GGT TTA TTT ATA
GGT GTC GGT GTG GCT CCA ACT AAT GAG ATT
TAC ACT CTA CGT GAA TTG GTT CAC AGT TTA
GGC ATC TCT AAG CCA ACA ATT GTA TTT AGT
TCT AAA AAA GGA TTA GAT AAA GTT ATA ACT
GTA CAA AAA ACG GTA ACT GCT ATT AAA ACC
ATT GTT ATA TTG GAC AGC AAA GTG GAT TAT
AGA GGT TAT CAA TCC ATG GAC AAC TTT ATT
AAA AAA AAC ACT CCA CAA GGT TTC AAA GGA
TCA AGT TTT AAA ACT GTA GAA GTT AAC CGC

```

第6図 (その2)

```

AAA GAA CAA GTT GCT CTT ATA ATG AAC TCT1174
TCG GGT TCA ACC GGT TTG CCA AAA GGT GTG1175
CAA CTT ACT CAT GAA AAT GCA GTC ACT AGA1176
TTT TCT CAC GCT AGA GAT CCA ATT TAT GGA1177
AAC CAA GTT TCA CCA GGC ACG GCT ATT TTA1178
ACT GTA GTA CCA TTC CAT CAT GGT TTT GGT1179
ATG TTT ACT ACT TTA GGC TAT CTA ACT TGT1180
GGT TTT CGT ATT GTC ATG TTA ACG AAA TTT1181
GAC GAA GAG ACT TTT TTA AAA ACA CTG CAA1182
GAT TAC AAA TGT TCA AGC GTT ATT CTT GTA1183
CCG ACT TTG TTT GCA ATT CTT AAT AGA AGT1184
GAA TTA CTC GAT AAA TAT GAT TTA TCA AAT1185
TTA GTT GAA ATT GCA TCT GGC GGA GCA CCT1186
TTA TCT AAA GAA ATT GGT GAA GCT GTT GCT1187
AGA CGT TTT AAT TTA CCG GGT GTT CGT CAA1188
GGC TAT GGT TTA ACA GAA ACA ACC TCT GCA1189
ATT ATT ATC ACA CCG GAA GGC GAT GAT AAA1190
CCA GGT GCT TCT GGC AAA GTT GTG CCA TTA1191
TTT AAA GCA AAA GTT ATC GAT CTT GAT ACT1192

```

第7図 (その1)

```

Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile1193
Val Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Ile1194
Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg1195
Lys Tyr Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly1196
Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu Thr Gly1197
Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu1198
Lys Ser Cys Cys Leu Gly Glu Ala Leu Lys1199
Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile1200
Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe1201
Phe Ile Pro Val Leu Ala Gly Leu Phe Ile1202
Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile1203
Tyr Thr Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu1204
Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val Phe Ser1205
Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr1206
Val Gln Lys Thr Val Thr Ala Ile Lys Thr1207
Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr1208
Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile1209
Lys Lys Asn Thr Pro Gln Gly Phe Lys Gly1210
Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg1211

```

第6図 (その3)

```

AAA AAA ACT TTG GGC CCG AAC AGA CGT GGA1174
GAA GTT TGT GTA AAG GGT CCT ATG CTT ATG1175
AAA GGT TAT GTA GAT AAT CCA GAA GCA ACA1176
AGA GAA ATC ATA GAT GAA GAA GGT TGG TTG1177
CAC ACA GGA GAT ATT GGG TAT TAC GAT GAA1178
GAA AAA CAT TTC TTT ATC GTG GAT CGT TTG1179
AAG TCT TTA ATC AAA TAC AAA GGA TAT CAA1180
GTA CCA CCT GCT GAA TTA GAA TCT GTT CTT1181
TTG CAA CAT CCA AAT ATT TTT GAT GCC GGC1182
GTT GCT GGC GTT CCA GAT CCT ATA GCT GGT1183
GAG CTT CCG GGA GCT GTT GTT GTA CTT GAA1184
AAA GGA AAA TCT ATG ACT GAA AAA GAA GTA1185
ATG GAT TAC GTT GCT ACT CAA GTT TCA AAT1186
GCA AAA CGT TTG CGT GGT GGT GTC CGT TTT1187
GTG GAC GAA GTA CCT AAA GGT CTC ACT GGT1188
AAA ATT GAC GGT AAA GCA ATT AGA GAA ATA1189
CTG AAG AAA CCA GTT GCT AAG ATG1190

```

第7図 (その2)

```

Lys Glu Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser1212
Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val1213
Gln Leu Thr His Glu Asn Ala Val Thr Arg1214
Phe Ser His Ala Arg Asp Pro Ile Tyr Gly1215
Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu1216
Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly1217
Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu Thr Cys1218
Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe1219
Asp Glu Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln1220
Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile Leu Val1221
Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser1222
Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Asp Leu Ser Asn1223
Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro1224
Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala1225
Arg Arg Phe Asn Leu Pro Gly Val Arg Gln1226
Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala1227
Ile Ile Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys1228
Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val Pro Leu1229
Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr1230

```

第 7 図 (その 3)

Lys Lys Thr Leu Gly Pro Asn Arg Arg 390
 Gly 400
 Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met 410
 Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr 420
 Arg Glu Ile Ile Asp Glu Glu Gly Trp Leu 430
 His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu 440
 Glu Lys His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu 450
 Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Gln 460
 Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu 470
 Leu Gln His Pro Asn Ile Phe Asp Ala Gly 480
 Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly 490
 Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Glu 500
 Lys Gly Lys Ser Met Thr Glu Lys Glu Val 510
 Met Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Ser Asn 520
 Ala Lys Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe 530
 Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly 540
 Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile 550
 Leu Lys Lys Pro Val Ala Lys Met

第 8 図 (その 1)

ATG GAA AAC ATG GAG AAC GAT GAA AAT ATT 10
 Met Glu Asn Met Glu Asn Asp Glu Asn Ile 20
 GTG TAT GGT CCT GAA CCA TTT TAC CCT ATT 30
 Val Tyr Gly Pro Glu Pro Phe Tyr Pro Ile 40
 GAA GAG GGA TCT GCT GGA GCA CAA TTG CGC 50
 Glu Glu Gly Ser Ala Gly Ala Gln Leu Arg 60
 AAG TAT ATG GAT CGA TAT GCA AAA CTT GGA 70
 Lys Tyr Met Asp Arg Tyr Ala Lys Leu Gly 80
 GCA ATT GCT TTT ACT AAC GCA CTT ACC GGT 90
 Ala Ile Ala Phe Thr Asn Ala Leu Thr Gly 100
 GTC GAT TAT ACG TAC GCC GAA TAC TTA GAA 110
 Val Asp Tyr Thr Tyr Ala Glu Tyr Leu Glu 120
 AAA TCA TGC TGT CTA GGA GAG GCT TTA AAG 130
 Lys Ser Cys Cys Leu Gly Glu Ala Leu Lys 140
 AAT TAT GGT TTG GTT GTT GAT GGA AGA ATT 150
 Asn Tyr Gly Leu Val Val Asp Gly Arg Ile 160
 GCG TTA TGC AGT GAA AAC TGT GAA GAA TTC 170
 Ala Leu Cys Ser Glu Asn Cys Glu Glu Phe 180
 TTT ATT CCT GTA TTA GCC GGT TTA TTT ATA 190
 Phe Ile Pro Val Leu Ala Gly Leu Phe Ile 200
 GGT GTC GGT GTG GCT CCA ACT AAT GAG ATT 210
 Gly Val Gly Val Ala Pro Thr Asn Glu Ile 220
 TAC ACT CTA CGT GAA TTG GTT CAC AGT TTA 230
 Tyr Thr Leu Arg Glu Leu Val His Ser Leu 240

第 8 図 (その 2)

GGC ATC TCT AAG CCA ACA ATT GTA TTT AGT 130
 Gly Ile Ser Lys Pro Thr Ile Val Phe Ser 140
 TCT AAA AAA GGA TTA GAT AAA GTT ATA ACT 150
 Ser Lys Lys Gly Leu Asp Lys Val Ile Thr 160
 GTA CAA AAA ACG GTA ACT GCT ATT AAA ACC 170
 Val Gln Lys Thr Val Thr Ala Ile Lys Thr 180
 ATT GTT ATA TTG GAC AGC AAA GTG GAT TAT 190
 Ile Val Ile Leu Asp Ser Lys Val Asp Tyr 200
 AGA GGT TAT CAA TCC ATG GAC AAC TTT ATT 210
 Arg Gly Tyr Gln Ser Met Asp Asn Phe Ile 220
 AAA AAA AAC ACT CCA CAA GGT TTC AAA GGA 230
 Lys Lys Asn Thr Pro Gln Gly Phe Lys Gly 240
 TCA AGT TTT AAA ACT GTA GAA GTT AAC CGC 250
 Ser Ser Phe Lys Thr Val Glu Val Asn Arg 260
 AAA GAA CAA GTT GCT CTT ATA ATG AAC TCT 270
 Lys Glu Gln Val Ala Leu Ile Met Asn Ser 280
 TCG GGT TCA ACC GGT TTG CCA AAA GGT GTG 290
 Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val 300
 CAA CTT ACT CAT GAA AAT GCA GTC ACT AGA 310
 Gln Leu Thr His Glu Asn Ala Val Thr Arg 320
 TTT TCT CAC GCT AGA GAT CCA ATT TAT GGA 330
 Phe Ser His Ala Arg Asp Pro Ile Tyr Gly 340
 AAC CAA GTT TCA CCA GGC ACG GCT ATT TTA 350
 Asn Gln Val Ser Pro Gly Thr Ala Ile Leu 360

第 8 図 (その 3)

ACT GTA GTA CCA TTC CAT CAT GGT TTT GGT 370
 Thr Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly 380
 ATG TTT ACT ACT TTA GGC TAT CTA ACT TGT 390
 Met Phe Thr Thr Leu Gly Tyr Leu Thr Cys 400
 GGT TTT CGT ATT GTC ATG TTA ACG AAA TTT 410
 Gly Phe Arg Ile Val Met Leu Thr Lys Phe 420
 GAC GAA GAG ACT TTT TTA AAA ACA CTG CAA 430
 Asp Glu Glu Thr Phe Leu Lys Thr Leu Gln 440
 GAT TAC AAA TGT TCA AGC GTT ATT CTT GTA 450
 Asp Tyr Lys Cys Ser Ser Val Ile Leu Val 460
 CCG ACT TTG TTT GCA ATT CTT AAT AGA AGT 470
 Pro Thr Leu Phe Ala Ile Leu Asn Arg Ser 480
 GAA TTA CTC GAT AAA TAT GAT TTA TCA AAT 490
 Glu Leu Leu Asp Lys Tyr Asp Leu Ser Asn 500
 TTA GTT GAA ATT GCA TCT GGC GGA GCA CCT 510
 Leu Val Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro 520
 TTA TCT AAA GAA ATT GGT GAA GCT GTT GCT 530
 Leu Ser Lys Glu Ile Gly Glu Ala Val Ala 540
 AGA CGT TTT AAT TTA CCG GGT GTT CGT CAA 550
 Arg Arg Phe Asn Leu Pro Gly Val Arg Gln 560
 GGC TAT GGT TTA ACA GAA ACA ACC TCT GCA 570
 Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala 580
 ATT ATT ATC ACA CCG GAA GGC GAT GAT AAA 590
 Ile Ile Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys 600

第 8 図 (そ の 4)

```

CCA GGT GCT TCT GGC AAA GTT GTG CCA TTA 370
Pro Gly Ala Ser Gly Lys Val Val Pro Leu
TTT AAA GCA AAA GTT ATC GAT CTT GAT ACT 380
Phe Lys Ala Lys Val Ile Asp Leu Asp Thr
AAA AAA ACT TTG GGC CCG AAC AGA CGT GGA 390
Lys Lys Thr Leu Gly Pro Asn Arg Arg Gly
GAA GTT TGT GTA AAG GGT CCT ATG CTT ATG 400
Glu Val Cys Val Lys Gly Pro Met Leu Met
AAA GGT TAT GTA GAT AAT CCA GAA GCA ACA 410
Lys Gly Tyr Val Asp Asn Pro Glu Ala Thr
AGA GAA ATC ATA GAT GAA GAA GGT TGG TTG 420
Arg Glu Ile Ile Asp Glu Glu Gly Trp Leu
CAC ACA GGA GAT ATT GGG TAT TAC GAT GAA 430
His Thr Gly Asp Ile Gly Tyr Tyr Asp Glu
GAA AAA CAT TTC TTT ATC GTG GAT CGT TTG 440
Glu Lys His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu
AAG TCT TTA ATC AAA TAC AAA GGA TAT CAA 450
Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly Tyr Glu
GTA CCA CCT GCT GAA TTA GAA TCT GTT CTT 460
Val Pro Pro Ala Glu Leu Glu Ser Val Leu
TTG CAA CAT CCA AAT ATT TTT GAT GCC GGC 470
Leu Glu His Pro Asn Ile Phe Asp Ala Gly
GTT GCT GGC GTT CCA GAT CCT ATA GCT GGT 480
Val Ala Gly Val Pro Asp Pro Ile Ala Gly

```

第 8 図 (そ の 5)

```

GAG CTT CCG GGA GCT GTT GTT GTA CTT GAA 490
Glu Leu Pro Gly Ala Val Val Val Leu Glu
AAA GGA AAA TCT ATG ACT GAA AAA GAA GTA 500
Lys Gly Lys Ser Met Thr Glu Lys Glu Val
ATG GAT TAC GTT GCT AGT CAA GTT TCA AAT 510
Met Asp Tyr Val Ala Ser Glu Val Ser Asn
GCA AAA CGT TTG CGT GGT GGT GTC CGT TTT 520
Ala Lys Arg Leu Arg Gly Gly Val Arg Phe
GTG GAC GAA GTA CCT AAA GGT CTC ACT GGT 530
Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu Thr Gly
AAA ATT GAC GGT AAA GCA ATT AGA GAA ATA 540
Lys Ile Asp Gly Lys Ala Ile Arg Glu Ile
CTG AAG AAA CCA GTT GCT AAG ATG
Leu Lys Lys Pro Val Ala Lys Met

```

(54) MAINTENANCE OF ACTIVITY OF ENZYME

(11) 2-171187 (A) (43) 2.7.1990 (19) JP
 (21) Appl. No. 63-326422 (22) 23.12.1988
 (71) MEIDENSHA CORP (72) SHIGEO AOYANAGI(2)
 (51) Int. Cl⁸. C12N9/96,G01N33/535

PURPOSE: To maintain activity of enzyme in the case of adding a solution of an organic compound in an organic solvent to an aqueous solution of an enzyme to be used for measuring an organism component by enzyme immunoassay, by using a specific organic solvent.

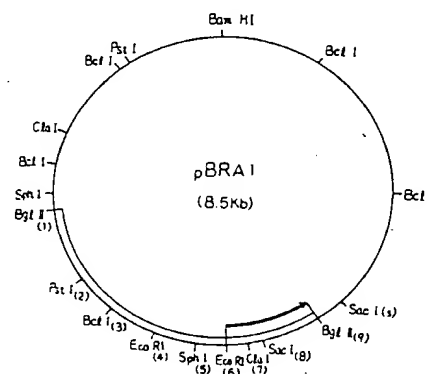
CONSTITUTION: When an organic solvent is used in the case of adding a solution of an organic compound in an organic solvent to an aqueous solution of an enzyme to be used for measuring an organism component by enzyme immunoassay, a solvent (e.g. N,N-dimethylformamide) to be hydrated of amide base, alcohol base or sulfoximide base is used as the organic solvent to maintain activity of the enzyme.

(54) DNA CHAIN HAVING BIALAPHOS-RESISTANT GENE

(11) 2-171188 (A) (43) 2.7.1990 (19) JP
 (21) Appl. No. 63-323635 (22) 23.12.1988
 (71) HOKKO CHEM IND CO LTD (72) KIYOSHI HIRASAWA(3)
 (51) Int. Cl⁸. C12N15/31,A01H1/00//A01N63/02(C12N15/31,C12R1/01)

PURPOSE: To selectively integrate a DNA fragment containing a bialaphos-resistant gene in the interior into a hybrid and to carry out cloning by bonding a DNA fragment derived from bialaphos-resistant ray fungus to a DNA fragment of specific plasmid.

CONSTITUTION: Whole DNA derived from bialaphos-resistant ray fungus AB2253 strain is scissored with restriction enzyme BglII to give a DNA fragment (A) having about 2.8kb molecular weight, which is bonded to a DNA fragment (B) prepared by scissoring DNA of plasmid pIJ703 derived from *Streptomyces lividans* with restriction enzyme BglII to give a DNA chain having restriction enzyme scission site shown by the figure and containing bialaphos-resistant gene in the interior.

**(54) LUCIFERASE GENE**

(11) 2-171189 (A) (43) 2.7.1990 (19) JP
 (21) Appl. No. 63-322029 (22) 22.12.1988
 (71) KIKKOMAN CORP (72) NAOKI KAJIYAMA(2)
 (51) Int. Cl⁸. C12N15/53//C12N9/02

PURPOSE: To isolate a gene of luciferase useful as an enzyme for ATP determination from luciferase of *Luciola lateralis* and to analyze structure of the gene.

CONSTITUTION: A DNA containing a gene to code luciferase of *Photinus pyralis* as a probe and this DNA is used as a probe to search a DNA containing a gene to code luciferase of *Luciola lateralis*. The luciferase gene has restriction scission map shown by the figure (EI is EcoRI, S is SspI, EV is EcoRV, A is ApaI and E is HpaI).

